Aus dem Hygienischen Institut der Universität Marbnrg/Lahn
Direktor Professor Dr. W. Pfannenstiel

Tierexperimentelle Untersuchungen über die Beeinflussung der Bifidus-Flora im Darm durch ein Kinder-Nährmittel

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der

Gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Friedel Corsmeier

approb. Arzt aus Lage/Lippe

Marburg 1939

Druck: Hessischer Verlag Karl Euker, Marburg-Lahn

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg
am 30. Oktober 1939.
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.
Referent: Prof. Dr. Pfannenstiel.

Seit dem Jahre 1934 hat sich die Geburtenzahl Deutschlands beträchtlich vergrößert. Dieser Geburtenanstieg beruht nicht nur auf der Zunahme der Eheschließungen mit ihren Erstgeburten, sondern auch auf der erfreulich großen Zahl von Dritt- und Mehrgeburten in den Altfamilien. Dennoch fehlen zur Bestanderhaltung unserer Volks- und Wehrkraft nach *Kirchhoff*[1]) immer noch fast 10 Proz. Nur ein vielseitiger Angriff auf dieses Problem hat Aussicht auf einen vollen Erfolg. Eine wesentliche Waffe in diesem Ringen um die Erhaltung unseres Nachwuchses ist der Kampf gegen die Sterblichkeit der erbbiologisch gesunden Kinder, insbesondere der Säuglinge. Bekanntlich sind die Sterblichkeitsziffern im frühen Säuglingsalter sehr hoch, um dann während der ersten Lebensjahre steil abzusinken. Die Erfolge, die in den letzten drei Jahrzehnten bezüglich der Verminderung der Säuglingssterblichkeit erzielt worden sind, sprechen deutlich für die geleistete wissenschaftliche Forschung und die praktische Hygiene. Die Sterblichkeit der Säuglinge, welche im Jahre 1901 noch 20,7 Proz. betrug, fiel stetig und erreichte nach *Kirchhoff*[1]) im Jahre 1937 den Prozentsatz von 6,3.

Dieser Erfolg ist außerordentlich groß, und nach Ansicht mancher Autoren ist die Säuglingssterblichkeit nahe an das überhaupt Erreichbare herangekommen. Berücksichtigen wir aber, daß unter den Ursachen dieser Sterblichkeit die Verdauungskrankheiten und im weiteren Sinne die Ernährungsstörungen, die oft durchaus vermeidbar sind, einen weiten Raum einnehmen, so ist zu hoffen, daß der Hundertsatz von 6,3 noch auf etwa 4,0 vermindert werden kann. Dadurch könnte nach Reichsberechnung (Wirtschaft und Statistik)[24]) die jährliche Geburtensollzahl um 46000 überboten und der Geburtenausfall der Kriegs- und Nachkriegsjahre ausgeglichen werden.

Die Ursachen für Ernährungsstörungen des Säuglings sind mannigfach. Am seltensten treten diese bekanntlich bei natürlicher Frauenmilch-Nahrung auf. Deshalb ist immer wieder die Forderung nach mindestens 6 Monate dauernder Stillzeit gestellt worden. Aber selbst in diesem günstigen Falle stellen sich beim Abstillen manchmal Ernährungsstörungen ein, welche die Grundlage für spätere Krankheiten bilden können. Entsprechend größer ist diese Gefahr natürlich bei vorzeitigem Abstillen, bei schwächlichen Säuglingen oder in den Fällen, wo das Kind aus verschiedenen Gründen von Beginn an künstlich ernährt werden muß.

Der grundlegende Unterschied zwischen natürlicher und künstlicher Ernährung kommt auch in der verschiedenen Darmflora zum Ausdruck. Bakteriologische Stuhluntersuchungen künstlich ernährter Säuglinge ergeben ein Gemisch von Bakterien, die meist gramnegativ sind und bei denen die Coli-Gruppe überwiegt. Dagegen herrscht in der sogenannten Frauenmilchflora das grampositive Bacterium bifidum vor.

Seit einiger Zeit haben wir Kenntnis von besonderen Eigenschaften des Bacterium bifidum. *Bessau*[2]) konnte nachweisen, daß diese Bakterien imstande sind, den Vitamin-B-Stoffwechsel zu verbessern, ja sogar wichtige Vitamin-Spender und -Bereiter darstellen. Besonders von paediatrischer Seite sind die Kenntnisse über die alimentären Möglichkeiten einer Anreicherung der Bifidus-Flora im Säuglingsdarm ausgenutzt worden, um auch bei künstlich ernährten Säuglingen eine dem Frauenmilchstuhl entsprechende Darmflora zu erzeugen und zu erhalten.

Die hierfür notwendige Zusammensetzung der Säuglingsnahrung läßt sich aber einwandfrei und sicher nur in Kinderkliniken oder ärztlich geleiteten Heimen erreichen. In Privathaushaltungen wird es sehr oft an Zeit und Geld mangeln. Die Darstellung eines möglichst billigen Fertigpräparates ist daher für diese erstrebenswert. Teils verdanken die vielen im Handel befindlichen Präparate ihre Entstehung wohl diesen Wünschen. Andererseits kann aber nicht genug vor Präparaten gewarnt werden, die nur auf Grund lauter Reklame von Müttern gekauft werden. Sehr oft fehlen diesen Präparaten die immer wieder angepriesenen Vorzüge. Sie sind dann geradezu schädlich, weil durch irrige Bezeichnungen wie „Vollkost" oder „Ganze Kost" der Eindruck erweckt wird, als genügten sie, den Säugling ausreichend zu ernähren[3]).

Die Friedrichsdorfer Zwieback- und Nährmittel-Fabrik Milupa-Pauly G. m. b. H. in Friedrichsdorf im Taunus stellt ebenfalls ein Präparat her, welches als „Pauly's Nährspeise" im Handel ist. Es wird hauptsächlich in Neuform-Reformhäusern feilgehalten und ist durch wirkungsvolle Reklame in den betreffenden Schaufenstern nicht zu übersehen. Jeder Packung dieses Mittels liegt ein Prospekt bei, aus dem u. a. hervorgeht, daß „der ausgezeichnete Einfluß von Pauly's Nährspeise auf Befinden und körperliche Entwicklung im Säuglings- und Kleinkindalter von Ärzten und Laien immer wieder bestätigt wird."

Laienurteile über Milupa-Pauly kenne ich nicht; statt dessen aber ärztliche Veröffentlichungen. *Horn*[4]) hat Pauly's Nährspeise untersucht und konnte vor allem die Vitamine, die laut Prospekt darin enthalten sein sollen, nicht nachweisen. *Wunderwald*[5]) berichtet über zwei Fälle, bei denen sich durch Ernährung und „Behandlung" mit Pauly's Nährspeise schwere gesundheitliche Störungen einstellten.

In den neueren mir vorliegenden Prospekten wird die Behauptung von einem Vitamingehalt nicht mehr aufgestellt. Außerdem weist man betont darauf hin, daß es sich bei Pauly's Nährspeise um eine Beinahrung handelt; es sollen desha'b wie üblich Fruchtsäfte zugefüttert werden. In welchem Maße nun diese Nährspeise als Beinahrung geeignet und nützlich ist, muß selbstverständlich von paediatrischer Seite entschieden werden.

Mir erscheint es jedoch von Interesse, vorher einmal festzustellen, ob durch Verfütterung von Pauly's Nährspeise überhaupt die wünschenswerte Bifidus-Flora erhalten oder gar erzeugt werden kann und somit eine der Forderungen, die man an ein gutes Kindernährmittel stellen muß, erfüllt wird.

Züchtung des Bacterium bifidum.

Die hier gestellte Aufgabe erforderte zunächst ein genaues Studium des Bacterium bifidum. Das ältere Schrifttum ist nicht sehr umfangreich, außerdem aber auch voller Widersprüche. Nachdem *Bessau*[2]) auf die große Bedeutung des Bacterium bifidum hingewiesen hat, ist von paediatrischer Seite wie auch von Bakteriologen viel Neues erbracht worden.

Im Jahre 1899 hat *Tissier*[6]) a's Erster das Bacterium bifidum beschrieben. Aber in der Folgezeit machte die Züchtung große Schwierigkeiten; denn einmal handelt es sich beim Bact. bifidum um einen strengen Anaerobier, und zweitens stellt es große Anforderungen an den geeigneten Nährboden. Ein wirklich guter Nährboden jedoch hat bis in die jüngste Zeit gefehlt.

Zeißler und *Kaeckel*[7]) benötigten im Jahre 1922 vier Wochen zur Reinzüchtung. *Lauter*[8]) gelang es, Reinkulturen in 8 bis 10 Tagen zu erzielen. *Rühle*[9]) benutzte Löffler-Platten, weil er wegen der ähnlichen Gestalt an eine Verwandtschaft mit Diphtherie-Bazillen glaubte. Diese Annahme erwies sich später als irrig. Er erreichte jedoch eine Verkürzung der Züchtungszeit bis zur Reinkultur auf 2 bis 4 Tage. Gegen diese Methode wandten sich *Stransky* und *Maslowsky*[10]) und betonten noch 1928 ausdrücklich, daß Reinzüchtung auf festen Nährböden mit großen Schwierigkeiten verbunden wäre.

Vor etwa zwei Jahren wies *Blaurock*[11]) auf den günstigen Einfluß der schwefelhaltigen Aminosäure Cystin auf das Bifidus-Wachstum hin. Der von ihm angegebene Nährboden ist ein Cystin-Milchzucker-Leberagar: 500 g Leber werden in 1000 ccm Aqua dest. zwei Stunden lang gekocht und danach filtriert. Nach Wiederauffüllung mit destilliertem Wasser auf 1000 ccm werden 10 g Pepton, 5 g Kochsalz, 20 g Agar, 10 g Milchzucker und 0,1 g Cystin zugegeben.

Boventer[12]) untersuchte in einer eingehenden Arbeit das Bact. bifidum. Er bestätigte die sehr guten Eigenschaften des Blaurock-Nährbodens und kam zu dem Schluß, daß er als „der zur Zeit beste Nährboden für das Bact. bifidum angesehen werden muß".

Ich arbeitete während meiner Versuche absichtlich nur mit diesem Nährboden. Das erschien mir um so nötiger, als die früheren Angaben über das Bact. bifidum sehr oft voneinander abwichen, weil jeder Forscher einen neuen Nährboden erprobte. Die Festlegung der Morphologie und Physiologie des Bact. bifidum wurde dadurch nur erschwert.

Die Angaben über das Sauerstoff-Bedürfnis des Bact. bifidum sind z. B. sehr widerspruchsvoll. *Zeißler* und *Kaeckel*[7]), *Henneberg*[13]), *Rühle*[9]), *Kruse*[14]), *Schiaparelli*[15]), *Adam*[16]), *Stransky* und *Maslowsky*[10]) und *Boventer*[12]) rechnen den Bifidus zu den strengen Anaerobiern. *Blaurock*[11]) schließt sich dieser Meinung an, teilt aber mit, auch einmal aerobes Wachstum festgestellt zu haben. In diesem Falle handelte es sich jedoch, wie er ausdrücklich feststellt, um alte degenerierte Kulturen. *Noguchi*[17]), *Basten*[18]) und *Küthe*[19]) sind der Meinung, daß der Bifidus fakultativ-aerob wächst. Andere Autoren, von denen *Pesch* und *Zöllner*[20]) und *Orla Jensen*[21]) zu nennen sind, beobachteten ganz normales Wachstum unter aeroben Verhältnissen. Ich selbst habe nur unter streng anaeroben Bedingungen ein Bifidus-Wachstum feststellen können.

Als Ausgangsmaterial für die Versuche benutzte ich Säuglingsstuhl aus der hiesigen Frauenklinik. Die Proben stammten von gesunden, etwa 8 Tage alten Kindern, die nur mit Frauenmilch ernährt wurden. Es wurde darauf geachtet, daß der Stuhl möglichst frisch war, wie es auch *Boventer*[12]) vorschlägt. Ich brachte etwa 5 Ösen dieses Stuhls in möglichst wenig Bouillon und konnte ihn leicht mit einem sterilen Glasstäbchen zu einer homogenen Masse verrühren. Nach gutem Verreiben erhielt ich auch in Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 sehr gleichmäßige Aufschwemmungen. Die schönsten und übersichtlichsten Kulturen erhielt ich von den stark verdünnten Aufschwemmungen. Damit aber auch die nur in geringer Zahl vorhandenen Keime sicher erfaßt wurden, überimpfte ich regelmäßig von allen 3 Verdünnungsgraden 1 bis 2 Ösen auf die Blaurock-Platten. Anfangs wählte ich gewöhnliche Petrischalen und versuchte, die anaeroben Verhältnisse mit Hilfe eines Anaerostaten zu erzielen. Mittels einer Öldruckpumpe sollte das erforderliche Vakuum geschaffen werden.

Diese Methode versagte aber vollkommen. In keinem der 8 Stühle, die auf diese Weise untersucht wurden, konnte der Bifidus nachgewiesen werden. Durch kleine Undichtigkeiten in den Schläuchen oder Hähnen des Anaerostaten stieg der Druck und damit der Sauerstoff-

bestand innerhalb der Stunden bis zum nächsten Leerpumpen bereits ausreichend, um dem Bifidus die Wachstumsmöglichkeit zu nehmen. Spätere Versuche haben diese Feststellung bestätigt.

Boventer[12]) kommt in seiner Arbeit zu dem Ergebnis, daß sich zur Züchtung des Bact. bifidum am besten die Fortner-Methode eignet. Dabei wird der Sauerstoff in der Schale selbst verbraucht, und zwar in der Weise, daß auf eine Hälfte der Platte die zu züchtende Keimart, auf die andere Hälfte das Bacterium prodigiosum ausgestrichen wird. Der Verschluß gegen die Außenluft kann durch Gummi, Plastilin oder durch andere elastische, möglichst undurchlässige Stoffe erreicht werden.

Ich benutzte zunächst solche Platten, die zu Demonstrationszwecken im Institut vorhanden waren. Form und Größe sind bei beiden Plattenteilen gleich, so daß die freien Ränder von Deckel und Boden genau aufeinanderstoßen. Zwischen beiden liegt ein etwa 7 mm dicker Gummiring, in welchen die freien Glasränder durch Verschraubungen, die man außen aufsetzt, hineingepreßt werden.

Auch in diesen Platten konnte ich keinen Bifidus züchten. Die Ursache war hier ebenfalls ein unvollständiger Abschluß von der Außenluft. Die dicken Gummiringe waren sehr hart und wenig elastisch. Die Verschraubungen mußten daher sehr fest angezogen werden, wobei sogar einige Platten zersprangen und ausfielen. Das Fehlen jeglichen Bifidus-Wachstums auf den übrigen Platten bewies, daß hier der Verschluß auch nicht dicht genug war. Mit neuen Gummiringen wäre das Ergebnis vielleicht günstiger ausgefallen. Ihre Beschaffung war jedoch nicht möglich, und so habe ich auf eine Nachprüfung verzichtet.

Rühle[9]) hat schon früher eine andere Vorrichtung beschrieben, mit der zum Teil auch *Boventer*[12]) arbeitete. Bei dieser liegt der Gummiring nicht zwischen den beiden Schalenrändern, sondern läuft vielmehr als Band rings um die seitliche Schalenwand. Bei der nötigen Straffheit des Ringes wird ein fester Abschluß gewährleistet. Allerdings müssen die Schalen sehr gut gearbeitet sein. Der Deckel muß sich genau dem entsprechend verjüngten Rand der Bodenschale anfügen.

Die erforderlichen Schalen wurden angefertigt, dagegen waren die Gummiringe nicht erhältlich. Ich war deshalb gezwungen, mir einen vollwertigen Ersatz zu suchen und fand ihn nach einigen Versuchen in einem gebrauchten Motorradschlauch. Ich schnitt davon etwa 1,7 cm breite Streifen, die der Höhe der benutzten Schalen entsprachen. Im Verlauf der Untersuchungen konnte ich feststellen, daß diese Ersatzringe besonders vorteilhaft waren, wenn sie etwas breiter geschnitten wurden. Dadurch legten sie sich auch auf die peripheren Teile von Schalenboden und Deckel und sorgten durch den entstehen-

den Zug für noch besseren Abschluß. Die Technik des Verschließens erwies sich als einfach und im Gegensatz zu Plastilin sehr sauber. Bei einiger Übung ließ sich in kürzester Zeit eine größere Zahl von Platten verschließen.

In Verbindung mit dem Blaurock-Nährboden habe ich auf diese Weise das Bacterium bifidum züchten können. Die Stuhlproben entnahm ich in der erwähnten Art in der Universitäts-Frauenklinik. Von 7 Untersuchungen fielen 6 positiv aus. Grundsätzlich legte ich von jeder Stuhlprobe 6 Kulturen an. Da aber alle 6 Platten, die mit der einen negativen Stuhlprobe beimpft waren, kein Bifidus-Wachstum zeigten, so ist hierfür nicht etwa die Methode des Verschließens verantwortlich zu machen. Indessen ist anzunehmen, daß dieser Säugling darmkrank war. Ich habe die Ursache nicht zu klären versucht, da dies über den Rahmen der Arbeit hinausgegangen wäre. *Boventer*[12]) jedoch hat bei ähnlichem Versagen sechsmal eine bestehende Verdauungsstörung nachweisen können.

Die 6 positiven Befunde reichten völlig aus, um mich mit der Morphologie und Physiologie des Bifidus vertraut zu machen. Von den Kolonien aller Platten legte ich mehrere Subkulturen an. Meine Beobachtungen deckten sich alle mit den Feststellungen *Boventers*. Besonders gutes Wachstum zeigten diejenigen Platten, die ich mit möglichst vie'en Prodigiosus-Keimen beimpft hatte. Normalerweise waren die Kolonien von gut 1 mm Größe im Durchmesser. Sie wuchsen halbkugelig, waren mit glattem Rand scharf gegen die Umgebung abgegrenzt und weißglänzend. Meistens fehlte auch nicht der leichte gelbliche Schimmer im Zentrum der Kolonie. Dieser kam auffälliger zur Geltung, wenn die Kolonie nach einigen Passagen eine porzellanweiße Farbe annahm.

Blaurock[11]) unterscheidet zwei Arten von Bifidus-Kolonien. Die hier beschriebene „saftige" Wuchsform bezeichnet er als S-Typ. Den zweiten, den er R-Typ nennt und welcher „rauh wächst und sich schlecht von der Unterlage abheben läßt", habe ich nicht beobachten können. Das ist bei seiner Seltenheit *(Blaurock)* unter 6 Stämmen nicht verwunderlich. *Boventer*[12]) hat ihn unter 29 Stämmen nur zweimal nachweisen können.

Das mikroskopische Bild des Bacterium bifidum ist sehr mannigfaltig. *Boventer*[12]) schlägt eine Einteilung in drei Grundformen vor und unterscheidet zwischen Stäbchen, Keulen und Astformen. Dazwischen gibt es die verschiedensten Übergänge. Alle können nebeneinander in einer Ko'onie vorkommen. Jedoch sind meistens in den jungen Kolonien die Stäbchen weitaus in der Überzahl, bei älteren treten dann neben den Stäbchen hauptsächlich Keulen und Astformen auf. Bei einem Stamm konnte ich nach erst 24stündiger Bebrütung

fast nur Astformen beobachten. Ich überimpfte diese Kolonie und stellte nach 24 Stunden das normale Bild fest: viel Stäbchen und Keulen und wenig Astformen. Ich möchte annehmen, daß den Bakterien in jener einen Kultur durch noch nicht bekannte Einflüsse optimale Lebens- und Wachstumsbedingungen geboten wurden und daß deshalb die Astformen sich besonders schnell entwickeln konnten.

Tierversuche.

Durch die Vorversuche ergab sich also, daß Bact. bifidum auf Blaurock-Platten bei strengem Luftabschluß gut zu züchten ist. Nun konnten die Fütterungs-Versuche mit Pauly's Nährspeise beginnen, um festzustellen, ob diese in der Lage ist, die wünschenswerte Bifidus-Flora zu erzeugen oder zu vermehren.

Da derartige Versuche an Säuglingen nicht ohne weiteres durchführbar sind, mußte ich zunächst geeignete Versuchstiere ausfindig machen. Nach *Breit*[22]) ist beim Pferd, Schaf, Kaninchen, Meerschweinchen und bei der Katze und der Maus kein Bacterium bifidum nachzuweisen. *Rettger* und *Weiß*[23]) hatten ebenfalls bei Affen, Pferden, Kühen und Katzen negative Befunde; hingegen gelang ihnen der Bifidus-Nachweis bei Ratten.

Aus diesem Grunde wählte ich junge weiße Ratten. Es tauchte die Frage auf, in welcher Form Pauly's Nährspeise an die Ratten verfüttert werden sollte. Im Handel ist das Präparat in etwas grober Pulverform käuflich. Um den Bedürfnissen der Ratten als Nagetiere gerecht zu werden, wurde die Herstellerfirma beauftragt, die Nährspeise in gepreßter Form zu liefern. Als indifferentes Bindemittel wurde 2%iger Traganth benutzt, gleichzeitig sollte 2% Calcium lacticum zugegeben werden. Das so hergestellte Preßgut hatte die Form kleiner Ziegelsteine, jedes Stück wog 10 g.

Ich setzte fünf Versuchsreihen mit je 10 Ratten an. Reihe I erhielt nur Pauly's Nährspeise. Reihe II wurde vergleichsweise mit drei verschiedenen Mehlen, die ebenfalls gepreßt waren, gefüttert. Diese Tiere bekamen täglich abwechselnd Hafer-, Mais- und Reis-Mehl. Reihe III erhielt normales Mischfutter, also verschiedene Brotsorten, Möhren, gekochte Kartoffeln und Fleisch. Die Reihe IV wurde mit Mischfutter und täglichen Zugaben von Milupa-Pauly gefüttert, Reihe V mit Mischfutter und täglich mit einer der drei Mehlsorten. Auf diese Weise waren genügend Vergleichsmöglichkeiten gegeben. Ich habe sie ausführlicher im zweiten Teil dieses Kapitels ausgewertet.

Vor Beginn der Versuche fütterte ich alle 50 Ratten eine Woche lang gleichmäßig mit Mischfutter. Nach diesen acht Tagen untersuchte ich die Fäces sämtlicher Tiere. Für diese große Zahl gleichzeitiger Untersuchungen erwies sich die Gummiring-Methode als

praktisch und schnell. Größere Schwierigkeiten ließ die Gewinnung möglichst frischen Darminhalts erwarten. Jedoch kam mir eine Beobachtung zu Hilfe: Wenn die Ratten umgesetzt oder gewogen und dazu mit einer langschenkligen Zange am Schwanz gefaßt wurden, so daß der Kopf nach unten hing, entleerten die Tiere reflektorisch mehr oder weniger viel des Darminhalts.

Auf diese Weise erhielt ich immer frische Fäces, die durch Keime der Außenwelt nicht verunreinigt wurden. Die etwas festen und geformten Kotmassen entnahm ich mit einer sterilen Pinzette beim Austritt aus dem Anus und ließ sie in ein bereitstehendes steriles Röhrchen mit Bouillon fallen. Dies Verfahren gelang immer.

Die so gewonnenen und in Bouillon aufbewahrten Stuhlproben blieben ungefähr eine Stunde bei Zimmertemperatur verschlossen stehen. Das hatte den großen Vorteil, daß die Fäces gut durchtränkt wurden und ich sie mit einem Glasstab sehr leicht zu einer feinen homogenen Masse verrühren konnte. Die Aufschwemmung wurde anschließend mit Bouillon ungefähr im Verhältnis 1:10 verdünnt. Eine ganz gleichmäßige Verdünnung erübrigte sich, weil ich nicht von allen Ratten die gleiche Kotmenge erhalten konnte. Von jeder Aufschwemmung wurde ein Grampräparat und gleichzeitig je eine Kultur auf Endo- und Blaurock-Platten angelegt.

Bei der ersten Untersuchung vor Beginn der Fütterungsversuche konnte ich bei keiner der 50 Ratten das Bacterium bifidum nachweisen. Das bakteriologische Bild war bei den Stuhlproben aller Tiere das gleiche.

In den Bouillonpräparaten fand sich eine Mischflora, die durch das Vorherrschen des Bacterium coli stark gramnegativ war. Außer Bact. coli fanden sich dicke, grampositive und gramnegative Stäbchen von fast doppelter Bifidusgröße und besonders viel Kokken, deren größerer Teil gramnegativ war.

Auf den vom gleichen Material angelegten Endoplatten wuchsen zum überwiegenden Teil Coli-Kolonien. Ebenfalls zahlreich waren die Kolonien verschiedener Kokken. Bacterium proteus wuchs auf fast allen Platten und verriet sich schon makroskopisch durch seine Schleierbildung.

Auch auf den Blaurock-Platten gediehen in erster Linie Coli-Bakterien. Sie zeigten hier flache Kolonien von grauweißer Farbe. Die Mehrzahl ist größer als beim Bifidus. Niemals ist auch der für Bifidus charakteristische gelbliche Schimmer im Mittelpunkt einer Kolonie vorhanden. Anfangs machte ich von nicht ganz eindeutigen Kolonien Grampräparate, ohne jemals das Bacterium bifidum nachweisen zu können.

Die nächsten Proben entnahm ich acht Tage später, gleichfalls von allen Tieren. Aus den Bouillonpräparaten ergab sich kein Unterschied gegenüber den vorigen. Auch die Endoplatten boten weiterhin das stark gramnegative Bild, das durch Bact. coli und Bact. proteus hervorgerufen wurde. Art und Mengenverhältnis waren dieselben geblieben. Auf den Blaurock-Kulturen fand sich auch diesmal das Bact. bifidum nicht. Durch das zweimalige negative Ergebnis veranlaßt, kontrollierte ich daraufhin den Nährboden, mit dem Erfolg, daß ich aus einem Frauenmilchstuhl nach drei Tagen den Bifidus in Reinkultur vorfand.

Im weiteren Verlauf habe ich nach einer Woche nochmals den Stuhl der allein mit Milupa-Pauly gefütterten Ratten der Reihe I untersucht. Das mikroskopische Bild der Bouillonpräparate war unverändert. Jedoch konnte ich auf 70 % der Blaurock-Platten, also bei 7 Ratten, jetzt einwandfrei den Bifidus nachweisen. Die Zahl der Bifidus-Kolonien schwankte bei fünf positiven Platten zwischen 8 und 19. Auf zwei Platten wuchs der Bifidus zahlreicher, und zwar in der dargestellten Art: weißglänzend, halbkugelig und mit scharfem Rand gegen die Umgebung abgesetzt. Durchschnittlich ergab das mikroskopische Bild sehr viel Keulen, etwas weniger Stäbchen und vereinzelt Astformen. Letztere vermehrten sich in älteren Kulturen beträchtlich. In Subkulturen führte ich Kontrollversuche zur Klärung des Sauerstoff-Bedürfnisses aus. Ich habe diese oftmals wiederholt, konnte aber in keinem Falle aerobes Wachstum feststellen.

Bei der nächsten Untersuchung konnte ich erstmalig auch im Kot der mit Pauly's Nährspeise und Mischfutter gefütterten Ratten der Reihe IV das Bacterium bifidum nachweisen. Allerdings auch hier nicht bei allen, sondern nur bei 60 % der Tiere. Die zu derselben Zeit kontrollierten Tiere der Reihe I ergaben jetzt nur fünf positive Befunde.

Rettger und *Weiß*[23]) hatten den Bifidus bei Ratten ohne besondere Fütterung nachgewiesen. Deshalb versuchte ich noch einmal bei den 30 Tieren der Reihe II, III und V ein positives Ergebnis zu erzielen. Abermals jedoch blieb ein Bifidus-Wachstum aus; ebensowenig war in den Bouillonpräparaten das Bact. bifidum zu erkennen. Es ist demnach mit Bestimmtheit anzunehmen, daß die positiven Ergebnisse aus den Reihen I und IV von der Fütterung mit Pauly's Nährspeise herrührten.

Zu dieser Zeit war das Milupa-Preßgut verfüttert. Die zweite Sendung fiel anders aus; die einzelnen Stücke waren kleiner und viel härter, von hellerem Aussehen und anderem Geruch. Hier ist zu erwähnen, daß die Nährmittel-Fabrik Milupa-Pauly eine zweite Firma mit dem Pressen ihrer Nährspeise beauftragte. Da das Preßgut der zweiten Sendung schon äußerlich die erwähnten Veränderungen auf-

wies; ist anzunehmen, daß beim Pressen der Nährspeise ein Fehler gemacht wurde, indem höchstwahrscheinlich zuviel Bindematerial verwendet wurde. Die Freßlust der Tiere, welche diese neue Nahrung erhielten, nahm sichtlich ab.

Als die Tiere zwei Wochen lang von der neuen Milupa-Sendung gefressen hatten, untersuchte ich noch einmal alle 50 Ratten auf etwaiges Bifidus-Vorkommen. Der Befund bei den Reihen II, III und V blieb weiterhin negativ. Bedeutsam war aber, daß jetzt auch in der Reihe I das Bact. bifidum vollkommen fehlte. Bei Reihe IV war ein starker Rückgang zu verzeichnen: Von 10 Tieren waren 8 bifidusfrei. Die Ursache dieser Verminderung der Bifidus-Flora kann nur in der zweiten Milupa-Nährspeise liegen. Es ist anzunehmen, daß durch eine andere Zusammensetzung oder Verarbeitung der gepreßten Nährspeise vorher vorhandene bifidusfördernde Stoffe fehlten.

Es ist bekannt, daß natürlich ernährte Säuglinge bei Verdauungskrankheiten ihre bis dahin bestehende Bifidusflora einbüßen, bzw. daß die Menge des Bact. bifidum sich stark verringert. Daher erschien es mir von Bedeutung, die Bestätigung dieser Tatsache auch im Tierversuch zu erhalten. Es war also notwendig, die oben beschriebenen Ergebnisse in Verbindung zu bringen mit dem Gedeihen der Versuchstiere, wobei Aussehen, Verhalten und vor allem das Gewicht berücksichtigt werden mußten.

Zu Beginn der Versuche ließen sich keinerlei Unterschiede im Verhalten und Aussehen der 50 Tiere feststellen. Das Fell der Ratten blieb weich und glatt, sie verhielten sich recht lebhaft und zeigten große Freßlust. Begierig erwarteten sie an der Käfigtür ihr Futter. Der nur geringe Gewichtsunterschied der einzelnen Tiere war günstig. Ich konnte sie wahllos in die fünf Versuchsreihen einordnen, ohne daß sich das Durchschnittsgewicht der einzelnen Reihen deshalb voneinander entfernt hätte. Das durchschnittliche Anfangsgewicht ergibt sich aus Tabelle I und Abb. I. Es war praktisch bei allen fünf Reihen gleich.

Die Ratten wurden täglich gefüttert, und zwar mengenmäßig so reichlich, daß bei jeder Fütterung noch Reste vorhanden waren. Die Freßlust ließ bei den Tieren der Reihe II bald nach. Das war bei der einseitigen Mehlernährung zu erwarten und kam durch geringe Gewichtsabnahme schon nach acht Tagen zur Geltung. Auch in den nächsten 3 bis 4 Wochen änderte sich das Gewicht kaum.

Im Gegensatz hierzu zeigten die übrigen vier Reihen eine verschieden schnelle aber stetige Gewichtszunahme (Abb. I). Die Tiere waren weiterhin sehr lebhaft und fraßen viel und gern. Bemerkenswert ist, daß die mit Pauly's Nährspeise gefütterten Tiere schneller an Gewicht zunahmen als die der Mischfutter-Reihe. Hieraus erhellt

der gute Nährwert von Pauly's Nährspeise. Reihe IV, in welcher Mischfutter und Milupa zusammentraf, ergab einen viel steileren Gewichtsanstieg. Ihre einzelnen Wirkungen schienen sich addiert zu

Tabelle I.

	Anf.-Gew.	1 Wo.	2 Wo	3 Wo.	4 Wo	5 Wo.	6 Wo	7 Wo.
Reihe I	82,6	86,8	92,6	98,0	104,7	105 0	104,1	99,2
Reihe II	82,5	82,2	82,8	82,8	83,7	83,3	77,8	77,8
Reihe III	83,3	85,5	88,6	91,4	105,3	109,3	113,5	115,6
Reihe IV	85,9	98,0	103,3	114,4	129,3	132,5	138,9	147,2
Reihe V	81,0	92,6	100,3	106 5	122,4	123,1	126,3	130,4

haben; denn die Zunahme betrug fast so viel wie die Summe der Gewichtszunahmen von Reihe I und III. In dieser Zeit des guten Gedeihens war sowohl bei Reihe IV als auch bei den nur mit Milupa gefütterten Tieren in vielen Fällen das Bact. bifidum nachweisbar.

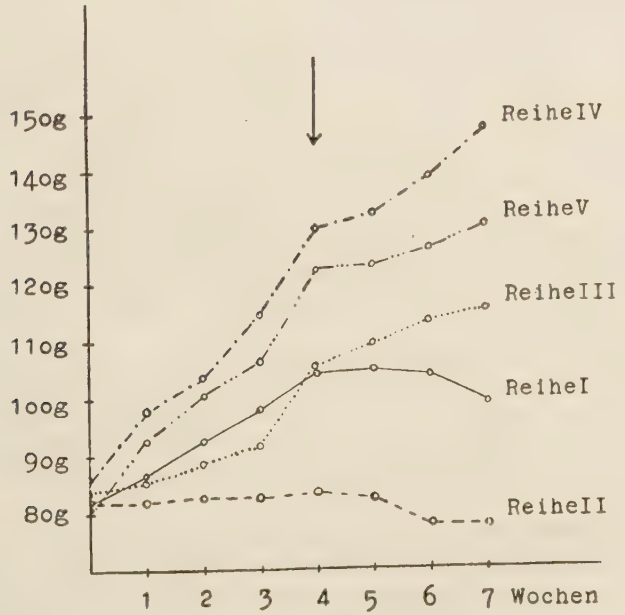

Abbildung I.

Wie aus Abb. I ersichtlich ist, nahmen aber auch die 10 Tiere der Reihe V recht gut an Gewicht zu. Die Kurven IV und V laufen in den ersten vier Versuchswochen parallel und Tab. II zeigt, daß die prozentuale Gewichtszunahme — auf das Anfangsgewicht bezogen — den Hundertsatz von 50 zu derselben Zeit überschritt.

Als Beifutter gegeben, waren die drei Mehle also in der Lage, wesentlich günstigere Ernährungsgrundlagen zu schaffen, als es Mischfutter allein bei der Reihe III vermochte. Trotz der guten Gewichtszunahme dieser Ratten konnte ich in ihrer Darmflora den Bifidus aber niemals nachweisen.

Die Reihen IV und V nahmen in gleicher Weise zu. Aber nur bei den Tieren der Reihe IV war der Bifidus festzustellen. Dies berechtigt zu der Annahme, daß die Nährspeise Milupa-Pauly bifidusfördernde Stoffe enthält.

Tabelle II.

Nach:	1 Wo.	2 Wo.	3 Wo.	4 Wo.	5 Wo.	6 Wo.	7 Wo.
Reihe I	5,08	12,10	18 64	26 75	27,11	26 03	20 09
Reihe II	- 0 36	0,36	0,36	1,45	- 0,24	-5.69	-5,69
Reihe III	2.64	3.72	9,72	27.14	31,21	36,25	38.77
Reihe IV	14.08	20.25	33.18	50 52	54.25	61,69	71,36
Reihe V	14 32	23.82	3I 48	51.11	51,97	55,92	60,98

Mit Beginn der fünften Woche änderte sich das Bild. Die Tiere der Reihe II verloren eine ganz geringe Gewichtszunahme bald wieder, und ihr Durchschnittsgewicht erreichte zum Schluß Werte, die 4,7 g unter dem Anfangsgewicht lagen. Sie machten einen elenden, kranken Eindruck. Sie saßen mit struppigem Fell zusammengekauert in der Ecke des Käfigs und zeigten selbst während der Fütterung keine „Anteilnahme".

Dieses Ende überraschte allerdings nicht sehr. Eine grundsätzliche Änderung trat jedoch bei Reihe I ein, und zwar in dem Augenblick, als die Tiere mit der Nährspeise der zweiten Sendung gefüttert wurden. Nach der oben beschriebenen verminderten Freßlust stellte sich zunächst ein Stillstand des Gewichts ein, das später beträchtlich abfiel.

Die bakteriologischen Untersuchungen aus dieser Zeit ergaben das völlige Verschwinden des Bacterium bifidum, obwohl es vorher bei 70 % der Ratten nachzuweisen war. Der Bifidus war also in dem Augenblick nicht mehr vorhanden, als das Gewicht der Tiere infolge einer veränderten Milupa-Fütterung absank.

Weshalb aber nahmen die Tiere der Reihe IV, die ebenfalls diese veränderte gepreßte Speise erhielten, nicht ab? Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß diese Ratten die Milupa-Würfel nur vereinzelt annagten und im übrigen nur noch das Mischfutter fraßen. Wegen der Darreichung dieses Mischfutters konnte ihr Gewicht weiter ansteigen (siehe Abb. I), und die deshalb wenig gestörte Verdauungsphysiologie bewirkte wohl das längere Verweilen des Bifidus, den ich bei der letzten Untersuchung in dieser Reihe noch zweimal nachweisen konnte.

Zusammenfassung.

Die guten Erfahrungen, die *Blaurock* und *Boventer* mit dem von *Blaurock* angegebenen Cystin-Milchzucker-Leberagar zur Züchtung des Bacterium bifidum machen konnten, werden bestätigt.

Das Bacterium bifidum ist zu den strengen Anaerobiern zu rechnen.

Zur Erzielung anaerober Verhältnisse ist die Fortner-Methode in Verbindung mit dem von *Rühle* angegebenen Gummiverfahren besonders geeignet.

In der normalen Darmflora weißer Ratten läßt sich das Bacterium bifidum nicht nachweisen.

Nach Verfütterung von Pauly's Nährspeise gelingt der Nachweis des Bacterium bifidum bei etwa 70 % der Ratten.

Es kann daher als erwiesen gelten, daß Pauly's Nährspeise bifidusfördernde Stoffe enthält.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. *Pfannenstiel* für die Überlassung des Themas und sein Interesse an meiner Arbeit meinen Dank auszusprechen.

Schrifttum.

1. *Kirchhoff, H.:* Ziel und Weg, Jhrg. 9, Heft 16, S. 504.
2. *Bessau:* Münch. Med. Wschr., Ref., Heft 84, S. 712 (1937).
3. *Werberat d. Dtsch. Wirtschaft:* Wirtschaftswerbung, Heft 3, S. 18 (1939).
4. *Horn:* Med. Kl. S. 1401 (1937).
5. *Wunderwald:* Dt. Med. Wschr. II, S. 1951 (1937).
6. *Tissier:* Recherche sur la flore intestinale des nourissons, Paris 1900.
7. *Zeißler* und *Kaeckel:* Jb. Kinderheilk. Bd. 99, S. 308 (1922).
8. *Lauter, L.:* Zbl. f. Bakter. I. Orig. Bd. 8., S. 579 (1921).
9. *Rühle, R.:* Jb. Kinderheilk. Bd. 106, S. 21 (1924).
10. *Stransky* und *Maslowsky, H.:* Z. Kinderheilk. Bd. 43, S. 717 (1927).
11. *Blaurock, G.:* Mschr. Kinderheilk. Bd. 86, S. 304 (1937).
12. *Boventer, K.:* Zbl. f. Bakter. I. Orig., Bd. 142, S. 419 (1938).
13. *Henneberg, W.:* Zbl. f. Bakter. I. Orig., Bd. 136, S. 36 (1936).
14. *Kruse:* Allg. Mikrobiologie, Leipzig 1910.
15. *Schiaparelli, P.:* zitiert nach Boventer.
16. *Adam, A.:* Z. Kinderheilk. Bd. 31, S. 331 und 361 (1922).
17. *Noguchi:* J. exper. Med., Bd. 12, S. 182 (1910).
18. *Basten, J.:* Zbl. f. Hyg., Bd. 77, S. 282 (1914).
19. *Küthe, H.:* Zbl. f. B akter. I. Orig., Bd. 76, S. 409 (1915).
20. *Pesch, K. L.* und *Zöllner, A.:* Arch. f. Hyg., Bd. 116, S. 295 (1936).
21. *Orla Jensen, S.:* Zbl. f. Bakter. II, Bd. 93, S. 321 (1936).
22. *Breit, E.:* Studien über die Darmflora d. Menschen, Inaug.-Dissert. 1935.
23. *Rettger* und *Weiß:* Lactobacillus Bifidus, Journ. of Bacter., Bd. 28, Nr. 5, S. 501 (1934).
24. *Wirtschaft und Statistik:* Nr. 6 (1939).

Lebenslauf.

Am 10. Oktober 1912 wurde ich, *Friedel Corsmeier,* als Sohn des Oberschullehrers Gustav Corsmeier und seiner Ehefrau Adele, geb. Brinkmann in Lage/Lippe geboren. Nach dreijährigem Volksschulbesuch kam ich auf die Realschule meiner Heimatstadt, die ich nach sechs Jahren — Ostern 1928 — wieder verließ. Die letzten drei Schuljahre besuchte ich die Oberrealschule in Herford, wo ich Ostern 1931 mein Reifezeugnis erhielt. Anschließend, im Sommer-Semester 1931, ging ich nach Marburg, um Medizin zu studieren. Nach fünf Semestern bestand ich hier im Sommer 1933 die ärztliche Vorprüfung. Während der ersten beiden klinischen Semester studierte ich in Berlin; das nächste Semester mußte ich wegen Krankheit aussetzen. Im Sommer-Semester 1935 kehrte ich nach Marburg zurück und bestand hier am 1. Juli 1937 das medizinische Staatsexamen. Die Medizinal-Praktikanten-Zeit verbrachte ich vom 1. August bis Ende des Jahres 1937 am Hygienischen Institut in Marburg, ab 1. Januar 1938 am Städt. Krankenhaus in Bielefeld, zunächst vier Monate auf der inneren, später auf der chirurgischen Abteilung. Nach der Approbation am 1. August 1938 war ich dort als Assistent tätig. Seit dem 1. Februar d. J. bin ich als Volontär-Assistent wieder am Hygienischen Institut in Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Berlin: v. Bergmann, Rößle, Sauerbruch, Wagner;

in Marburg: Alverdes, Baur (†), Boeminghaus, Brock, Claussen, Dittler, Freudenberg, Göppert, Grüneisen, Grüter, Jacobshagen, Kehrer, Kestermann, Klapp, Klewitz, Kretschmer, Kutscher, Loebell, Meerwein, Nauck, Neumann, Pfannenstiel, Rix, Ruete, Schrader, Schwenkenbecher, Strecker, Uffenorde, Versé.